

MEDICIÓN DE LA FRECUENCIA DE ALETEO DE *Aedes aegypti* PROVENIENTES DE UNA REGIÓN DE VENEZUELA

¹Ángela Daboin, ²Luis Traviezo, ³Freddy Torrealba A, ⁴Tijani Gharbi.

¹Departamento de ingeniería electrónica. Universidad Nacional Experimental Politécnica

"Antonio José de Sucre", Vicerrectorado Barquisimeto, Venezuela. **E-mail:** aldaboin@unexpo.edu.ve

²Decanato de Ciencias de la Salud, Departamento de Medicina Preventiva y Social.

Sección de Parasitología, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA) Venezuela.

³Decanato de Ciencias y Tecnología, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" UCLA, Venezuela.

⁴Université de Franche Comté, Nanomedicine Lab, Imagery and Therapeutics, Francia.

RESUMEN

Con la finalidad de desarrollar trampas inteligentes como mecanismos de control vectorial para la prevención y disminución de enfermedades metaxénicas, se determina un parámetro fisiológico como la frecuencia de aleteo empleado para posterior caracterización por género del mosquito *Aedes aegypti* en cepas venezolanas. Para ello se realizaron registros acústicos con muestras silvestres colectadas en depósitos de aguas de lluvia y emergidas en condiciones controladas en el laboratorio. Las grabaciones se hicieron durante un minuto, en más de un centenar de mosquitos de esta especie y en ambos sexos, empleando un micrófono de velocidad de partículas conectado a la entrada de audio de un computador portátil y un programa especializado para registros acústicos. Se realizó un análisis espectral de las muestras determinándose que la frecuencia fundamental promedio de aleteo para las hembras correspondía a $454,78 \pm 55,19$ Hz y para los machos $688,39 \pm 40,82$ Hz, concluyendo que los grupos están muy separados en su frecuencia fundamental, con lo cual este parámetro es una característica biunívoca que puede ser empleada para la detección y clasificación de mosquitos de esta especie, utilizando inteligencia artificial en dispositivos de captura para la monitorización y control vectorial.

Palabras clave: *Aedes*, aleteo, vector, Venezuela.

ABSTRACT

MEASUREMENT OF THE WINGBEAT FREQUENCY OF THE *Aedes aegypti* PROVENIENTS FROM A REGION OF VENEZUELA

In order to develop intelligent traps as vector control mechanisms for the prevention and reduction of metaxenic diseases, a physiological parameter is determined as the wingbeat frequency used for later characterization by genus of the *Aedes aegypti* mosquito in Venezuelan strains. For this, acoustic records were made with wild samples collected in rainwater reservoirs and emerged under controlled conditions in the laboratory. The recordings were made during one minute, in more than a hundred mosquitoes of this species and in both sexes, using a particle speed microphone connected to the audio input of a portable computer and a specialized program for acoustic records. A spectral analysis of the samples was carried out, determining that the average fundamental frequency of flutter for females corresponded to 454.78 ± 55.19 Hz and for males 688.39 ± 40.82 Hz, concluding that the groups were very separated in its fundamental frequency, with which this parameter is a characteristic that can be used for the detection and classification of mosquitoes of this species, using artificial intelligence in capture devices for vector monitoring and control.

Key words: *Aedes*, wingbeat, vector, Venezuela

Recibido: 10/07/2017. Aprobado: 21/11/2017

INTRODUCCIÓN

Desde el siglo XVII hasta principios del siglo XX, enfermedades como la malaria, fiebre amarilla, dengue, leishmaniasis, entre otras, transmitidas por vectores artrópodos, como los mosquitos, fueron causas de numerosas muertes en el mundo, estableciéndose su control entre los años 1940 y 1950, según Gubler¹. Sin embargo, debido a diversas razones como el cambio climático y programas de control de corta durabilidad, estas enfermedades han resurgido en las últimas décadas convirtiéndose en un problema de salud pública, sobre todo en los países tropicales². Adicionalmente, la

aparición de nuevas enfermedades transmitidas específicamente por el *Aedes aegypti* (*A. aegypti*), vector del dengue, del Zika y de Chikungunya, han alarmado nuevamente al mundo y despertado el interés en nuevos sistemas de supervisión epidemiológica³.

Con el fin de desarrollar mecanismos de control más efectivos, se han estudiado algunas características biológicas de diferentes mosquitos, como su sentido acústico, hábitos alimenticios e interacción sexual, entre otros. La presencia de un sentido acústico en los mosquitos fue estudiada por Johnston en el año 1855 cuando descubrió un órgano sensorial en el segundo

segmento de la antena de los mosquitos, al que se le llamó posteriormente "órgano de Johnston"⁴.

Lo anterior condujo a numerosos experimentos con diferentes especies de mosquitos para estudiar el comportamiento de este sentido acústico bajo diferentes condiciones, tales como la edad, longitud de sus alas, sexo y condiciones ambientales y de alimentación. Trabajos realizados con diferentes especies, evidencian tempranas y continuas investigaciones sobre la frecuencia de aleteo de hembras y machos⁵. Otros estudios como el presentado por Ogawa⁶, para diferentes colonias de Anofelinos, revelan datos importantes sobre la frecuencia producida al batir sus alas bajo condiciones particulares en hembras vírgenes y fecundadas. Más tarde Mankin⁶ realiza registros acústicos con *Aedes taniorhynchus* emergiendo en marismas, en vuelos solos y en enjambres, para diferentes edades luego de su emergencia.

En años recientes, sigue presentándose la necesidad de explorar más sobre los aspectos biológicos y fisiológicos de mosquitos vectores de diferentes enfermedades, encontrándose diferentes experimentos que muestran hallazgos sobre el rango auditivo de ciertas especies de mosquitos, además de una convergencia armónica en el momento de su acoplamiento^{7,8,9,10}.

A pesar de la extensa literatura sobre la medición de estos parámetros, no existen experimentos relacionados con la medición de tonos de vuelos de mosquitos en ninguna región de Venezuela, la cual posee zonas endémicas de dengue, Chikungunya y zika¹¹, siendo éste un parámetro importante para el desarrollo de sistemas de clasificación por género y especies, los cuales pueden ser empleados en trampas inteligentes con carácter selectivo, bien sea para su control presencial o con motivos de exterminio.

En el presente trabajo se muestran los resultados de las mediciones, la metodología para la obtención de los registros y el análisis espectral de los tonos de vuelo del mosquito *A. aegypti* en ambos sexos, con el fin de obtener un registro sustentado con datos de la región, para el desarrollo de un posterior sistema de detección y clasificación que puede ser empleado en el desarrollo de trampas inteligentes para control vectorial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los registros acústicos se realizaron con un centenar de mosquitos *A. aegypti*, entre hembras y machos de la especie, con colonias emergidas y mantenidas en laboratorio. Para la obtención de la colonia de mosquitos, se almacenaron e incubaron en un frasco de vidrio, con agua de clorada, larvas colectadas en reservorios naturales provenientes de depósitos de agua de lluvia en una región endémica de dengue del territorio venezolano (Barquisimeto, estado Lara). Se introdujeron en frascos de vidrio y fueron colocadas dentro de unas jaulas metálicas de 50 cm³, con mallas de tul, con el objeto de evitar que los mosquitos escapasen una vez que

emergieran como adultos y provistas de una manga para extraer los mosquitos, como se ilustra en la Figura 1.

Las larvas fueron alimentadas con alimento peletizado para peces. Una vez emergidos como adultos, los mosquitos fueron clasificados por sexo, separándose en jaulas diferentes para evitar su cruce. De esta manera, se garantizan registros con hembras vírgenes (sin contacto con machos), haciendo más fácil su mantenimiento en cautiverio, al no necesitar sangre en su dieta alimenticia (luego de la cópula necesitarían alimentarse con sangre para oviponer). Para el mantenimiento de estas colonias de machos y hembras vírgenes, se colocó un algodón impregnado con solución azucarada al 30 %, con el fin de que los mosquitos se alimentaran^{7,12}, así como una pequeña planta para disminuir su estrés al tener donde posarse.

Para la extracción de los mosquitos desde las jaulas se empleó un capturador manual de vidrio, para luego trasladarlos a una cápsula de Petri. Esta cápsula se llevó a un congelador por un tiempo aproximado de dos minutos con el objetivo de inmovilizarlos o inactivarlos con frío. Empleando una mezcla de pegamentos no tóxicos (cola blanca escolar y pegamento de barra), se pegaron los mosquitos anestesiados en la superficie anterior dorsal del tórax, lejos del contacto de las antenas y las alas en la punta de un alfiler de acero para entomología de 4 mm, permitiendo así que al activarse, volaran libremente, como se observa en la Figura 2.

Para realizar las grabaciones y medir las frecuencias del tono de vuelo, se utilizó un micrófono de velocidad de partículas^{7,9,13} marca Knowless modelo NR-23158, cuya salida fue enviada a la entrada del micrófono de un computador portátil marca Lenovo i7 ideapad. Un diagrama del sistema de grabación se muestra en la Figura 3.

Para realizar las grabaciones y medir la frecuencia del tono de vuelo, los mosquitos una vez pegados al alfiler se colocaron a 1,5 cm del micrófono con el objetivo de capturar las señales y poder obtener los registros acústicos, tanto del macho como de la hembra.

Se emplearon los mejores registros para el análisis y se descartaron los vuelos de inicio y fin, obteniéndose archivos acústicos de 30 hembras y 30 machos, divididos por edades, de acuerdo a los días de su emergencia como adulto, tomándose los mejores registros que correspondieron a 18 hembras y 18 machos. Cada uno de los mosquitos fue grabado por separado utilizando el software Spectra PlusTM, realizándose grabaciones durante un minuto, para el primer, segundo y tercer día de su emergencia.

Las grabaciones fueron realizadas durante el día, entre las 8 y 10 am. a una temperatura de 27 ± 2 °C, una humedad relativa de 75 ± 6 %, con una frecuencia de muestreo de 96000 Hz a 16 bits de cuantización, empleando un solo canal (monoaural).

Para realizar el análisis espectral fue necesaria la preparación de los datos de la señal muestreada $x[n]$.

Primero, el filtrado de acondicionamiento para eliminar el pico de 60 Hz de la red eléctrica y la decimación debido a que los archivos de audio se realizaron con un muestreo muy elevado (96000 Hz). En la Figura 4 se ilustra el diagrama de acondicionamiento, donde se aprecian los siguientes pasos: filtro acondicionador, decimación con $N=16$ para el procesamiento del audio, disminuyendo así la frecuencia de muestreo a 6000 Hz con el fin de analizar solo el espectro que se consideró útil en los registros acústicos, sin presentar solapamiento. Seguidamente la segmentación y inventariado, para lo cual se eligió una ventana cuadrada de 0,1 segundos, equivalente a 600 muestras del registro de audio. Posteriormente el cálculo de la transformada discreta de Fourier (DFT) y finalmente el filtrado de los armónicos útiles.

Se seleccionó una transformada de 32.678 puntos¹⁴ que, considerando la tasa de muestreo de 6000 Hz, permite un paso de 0,193609 Hz, el cual se puede considerar adecuado para la señal bajo análisis, determinándose para cada ventana los tres primeros armónicos de cada ráfaga de vuelo. Este acondicionamiento y procesamiento de las señales acústicas, así como el cálculo de la transformada y filtrado de los armónicos se realizó mediante Matlab 7.0. Posteriormente se determinó la frecuencia promedio del armónico fundamental, así como su desviación típica para cada género.

RESULTADOS

Se realizaron registros acústicos a más de un centenar de mosquitos y se tomaron las mejores muestras, correspondientes a 18 hembras y 18 machos, considerando diferentes días de emergencia como adultos.

En las Figuras 5 y 6 se observa la señal en el dominio del tiempo (fragmento de un registro acústico) de una hembra y un macho respectivamente, para un segmento de una ráfaga particular. La intensidad de la señal se expresa en una relación entre el voltaje de la señal y un valor de referencia correspondiente al valor máximo del segmento analizado. Se reportan valores de voltajes menores a 0,01 mV.

Considerando que una de las características discriminantes entre los géneros de la especie es la frecuencia fundamental, se representa en el dominio de la frecuencia la señal de aleteo en las Figuras 7 y 8, donde se observa un diagrama espectral para una mejor visualización de la frecuencia fundamental y sus armónicos más importantes de un segmento de vuelo de un mosquito *A. aegypti* hembra, con sus tres primeros armónicos en $F_0= 387,6$ Hz, $F_1= 775,22$ Hz y $F_2= 1162,83$ Hz, mientras que para uno de los machos $F_0= 671,93$ Hz, $F_1= 1343,86$ Hz y $F_2= 2015,79$ Hz.

Se realizó una representación de las frecuencias promedios del primer armónico, su valor máximo y mínimo, y la desviación estándar, para mosquitos *A.*

aegypti nacidos entre uno y tres días, así como sus promedios y desviaciones totales. Estos datos se muestran en las Tablas 1 y 2.

Se observaron para el caso de las hembras cuatro correspondientes al primer día de emergidas como adulto, ocho del segundo día y seis del tercer día. Para el caso de los machos, se observan dos ejemplares del primer día, cinco del segundo día y 11 del tercer día de emergencia.

Se obtuvo una frecuencia promedio para la hembra de $454,78 \pm 55,19$ Hz, mientras que para los machos la frecuencia promedio fue de $688,39 \pm 40,82$ Hz.

DISCUSIÓN

El análisis realizado a cada señal acústica, tanto de hembras como machos *A. aegypti*, reportó resultados interesantes, permitiendo observar valores de frecuencias promedios y dispersión de los tres primeros armónicos de las señales acústicas, tanto para hembras y machos para diferentes días, luego de su emergencia. Además, se determinaron las amplitudes de cada armónico, así como la velocidad de cambio de la frecuencia entre cada ventana de observación, parámetro que se considera importante en recientes estudios¹⁵ sobre la caracterización del vuelo del *A. aegypti*.

El obtener el espectro de frecuencias en cada ventana, muestreando la señal en los intervalos de grabación establecidos previamente, permite además distinguir la existencia de otras características que se pueden considerar para realizar una futura clasificación entre otras especies de mosquitos.

Como se observa en la Tabla 1, la frecuencia promedio por individuo es variable, lo cual obedece a las edades de los mismos luego de su emergencia, presentando frecuencias más bajas en los primeros días, lo que era de esperarse, pues en las primeras horas de emergidos los mosquitos aún no han desarrollado completamente el tamaño de sus alas y su musculatura, lo que no les permite alcanzar mayores frecuencias de aleteo. Sin embargo, esta frecuencia se estabiliza luego del tercer día de su emergencia concordando con Ogawa⁵.

Se obtuvo una frecuencia promedio para la hembra de $454,78 \pm 55,19$ Hz, valores similares a los obtenidos en Cator⁹. Esta desviación es alta debido a que se comparan individuos de diferentes edades, pero se hace más pequeña a medida que alcanzan la madurez de sus alas.

Para los machos, se obtuvo una frecuencia promedio de $688,39 \pm 40,82$ Hz, cercanos a los valores reportados en Cator⁹. La dispersión en los machos fue superior a las hembras, incluso al alcanzar la madurez de su estructura, sin embargo, el promedio de la dispersión es similar al calculado en el grupo de hembras y no presentaría un problema si se utilizan estos datos para efectos de clasificación.

CONCLUSIONES

Este estudio corresponde a las primeras mediciones acústicas de vuelo realizadas en Venezuela del mosquito

A. aegypti, con muestras silvestres tomadas en una región endémica de dengue, Chikungunya y Zika del país y reportando resultados de frecuencia fundamental de vuelo correspondiente con literatura previa. Las frecuencias fundamentales de ambos sexos están ampliamente espaciadas, lo que puede utilizarse como característica en sistemas de clasificación o identificación de especies de mosquitos, por lo menos entre género y edad de emergencia, y extrapolarse la metodología para otras especies de mosquitos, vectores de enfermedades metaxénicas tropicales. Estos sistemas de clasificación podrán ser empleados en trampas inteligentes para el control vectorial.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Entomología Médica, Sección de Parasitología Médica de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA) por sus apoyo en la realización de las pruebas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Gubler D.1999. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem, *Emerging Infectious Diseases* 4: 442-450.
- 2 Rifakis P., Gonçalves N., Omaña W., Manso M., Espidel A., Intingaro A., Hernández O. y Rodríguez-Morales A. 2005. Asociación entre las variaciones climáticas y los casos de Dengue en un hospital de Caracas, Venezuela, 1998-2004. *Revista Perú medicina experimental salud pública* 22: 183-190.
- 3 Valero Nereida. Virus Zika: ¿Otro arbovirus emergente en Venezuela? *Invest. Clín [Internet]*. 2015 Sep [citado 2017 Jun 27]; 56(3): 241-242. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332015000300001&lng=es.
- 4 Göpfert M, Briegel H. y Robert D. 1999. Mosquito hearing: sound-induced antennal vibrations in male and female *Aedes aegypti*. *The Journal of Experimental Biology* 202: 2727-2738.
- 5 Mankin, R.; 1994. Acoustical Detection of *Aedes Taeniorhynchus* Swarms and Emergence Exoduses in Remote Salt Marshes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 10: 302-308.
- 6 Ogawa, K y Kanda T 1986. Wingbeat frequencies of some anopheline mosquitoes of east Asia (Diptera: Culicidae). *Japanese Society of Applied entomology and zoology* 21: 430-435.
- 7 Gibson, G. y Russell, I. 2006. Flyng in Tune: Sexual Recognition in Mosquitoes. *Current Biology* 16: 1311-16.
- 8 Silva, D.; De Souza V., Batista G.; Keogh E. y Ellis,D. 2014. Applying Machine Learning and Audio Analysis Techniques to Insect Recognition in Intelligent Traps. *Proceeding ICMLA '13 Proceedings of the 2013 12th International Conference on Machine Learning and Applications*. 1 (99-104).
- 9 Cator, L.; Arthur, B.; Harrington, L. y Hoy, R. 2009. Harmonic Convergence in the Love Songs of the Dengue Vector Mosquito. *Science* 323:1077-79.
- 10 Arthur, B., Emr, K., Wytenbach, R., y Hoy, R. 2014. Mosquito (*Aedes aegypti*) flight tones: Frequency, harmonicity, spherical spreading, and phase relationships. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 135(2), 933-941. Diponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3985972/>
- 11 Pan American Health Organization. Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country. [citado 2017 Jun 27] Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=37782&lang=en
- 12 Stobbart, R. 1992. Selection of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* for cheap an easy maintenance without bloodmeals. *Medicul arid Veteritary Entomology* 6: 82-87.
- 13 Warren, B. y Gibson, G. 2009. Sex Recognition Through Midflight Mating Duets in *Culex* Mosquitoes is Mediated by Acoustic Distortion. *Current Biology* 19: 485-491.
- 14 Hyatt, C. y Maughan, D; 1994. Fourier Analysis of wing beat signals: Assessing the effects of genetics alterations of flight muscle structure in Diptera. *Biophysical Journal* 67:1149-54.
- 15 Iams, A. 2012. Free flight of the mosquito *Aedes aegypti*. *Physics*. arXiv.org arXiv:1205.5260.

Figura 1. Jaula de 50 cm de arista donde se mantenían los imagos luego de su emergencia.



Figura 2. Mosquito pegado al alfiler de entomología para la medición acústica



Figura 3. Diagrama del sistema de grabación acústica

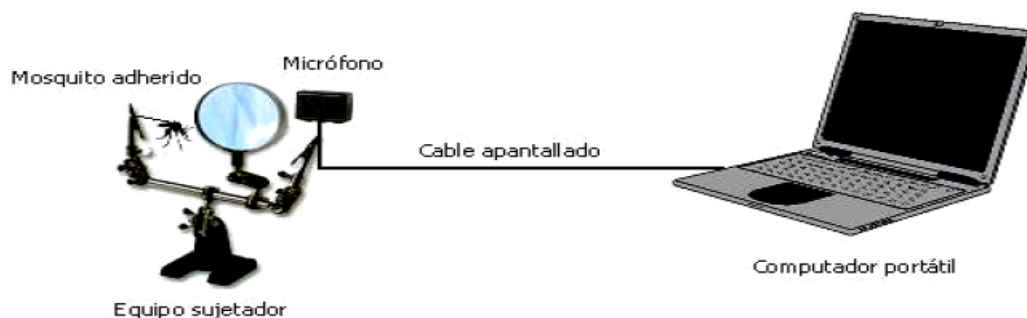


Figura 4. Procesamiento de la señal acústica del aleteo de los mosquitos

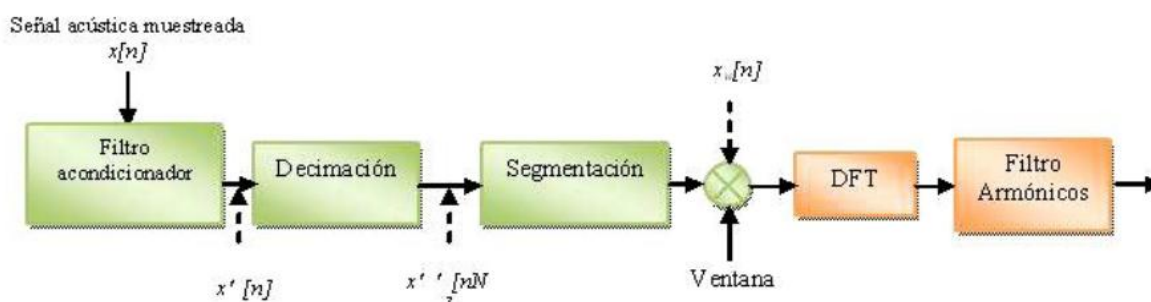


Figura 5. Fragmento de un registro acústico del vuelo de un mosquito *Aedes aegypti* hembra

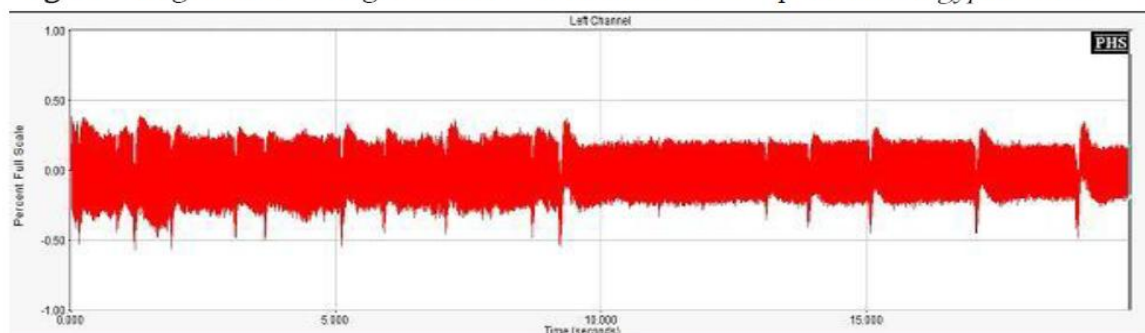


Figura 6. Fragmento de un registro acústico del vuelo de un mosquito *Aedes aegypti* macho

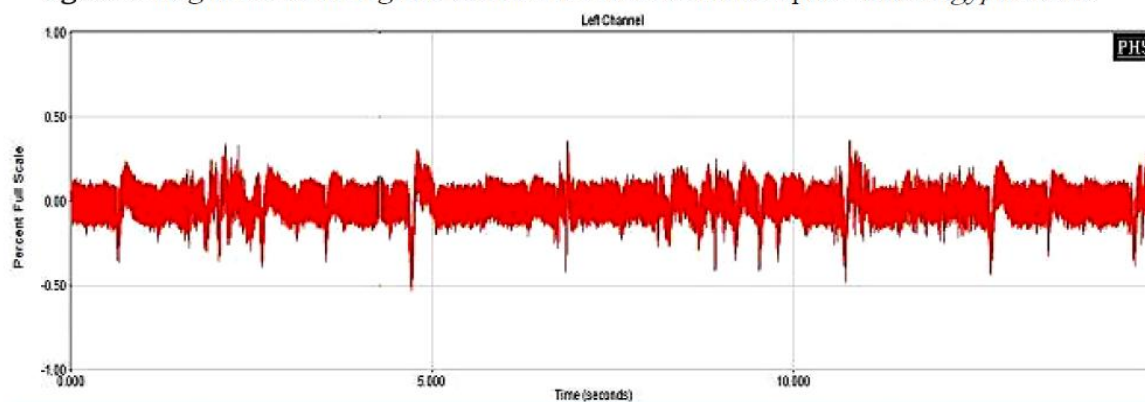


Figura 7. Diagrama espectral de un segmento de vuelo de un mosquito *Aedes aegypti* hembra

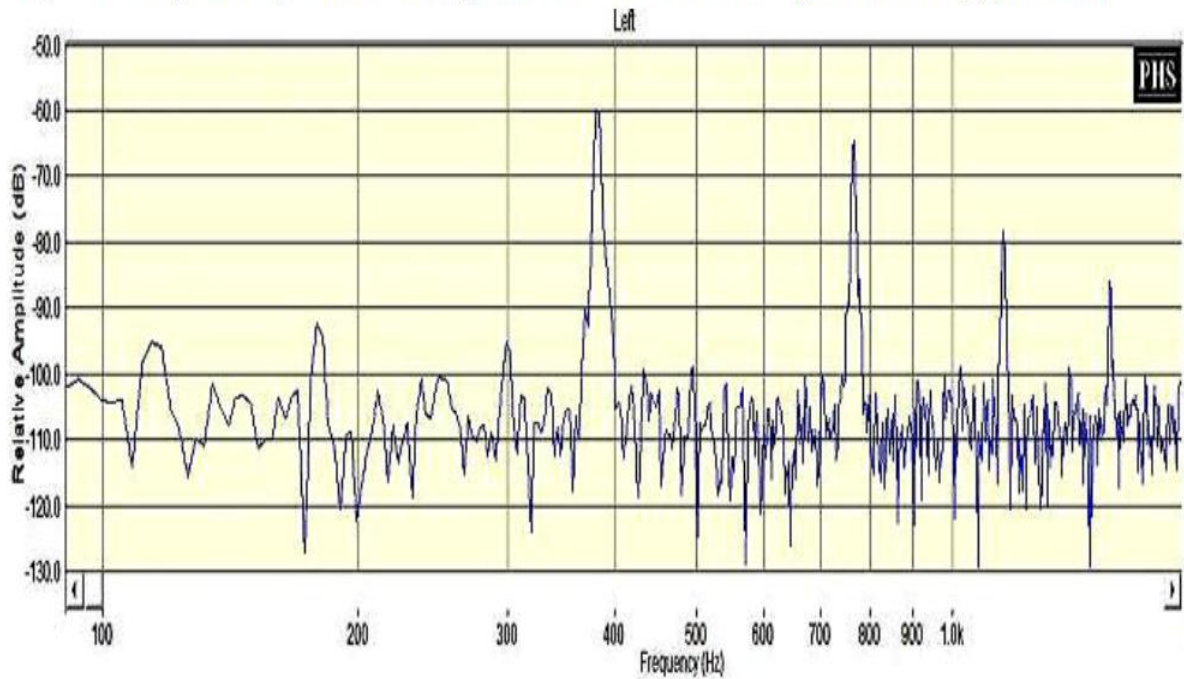


Figura 8. Diagrama espectral de un segmento de vuelo de un mosquito *A. aegypti* macho

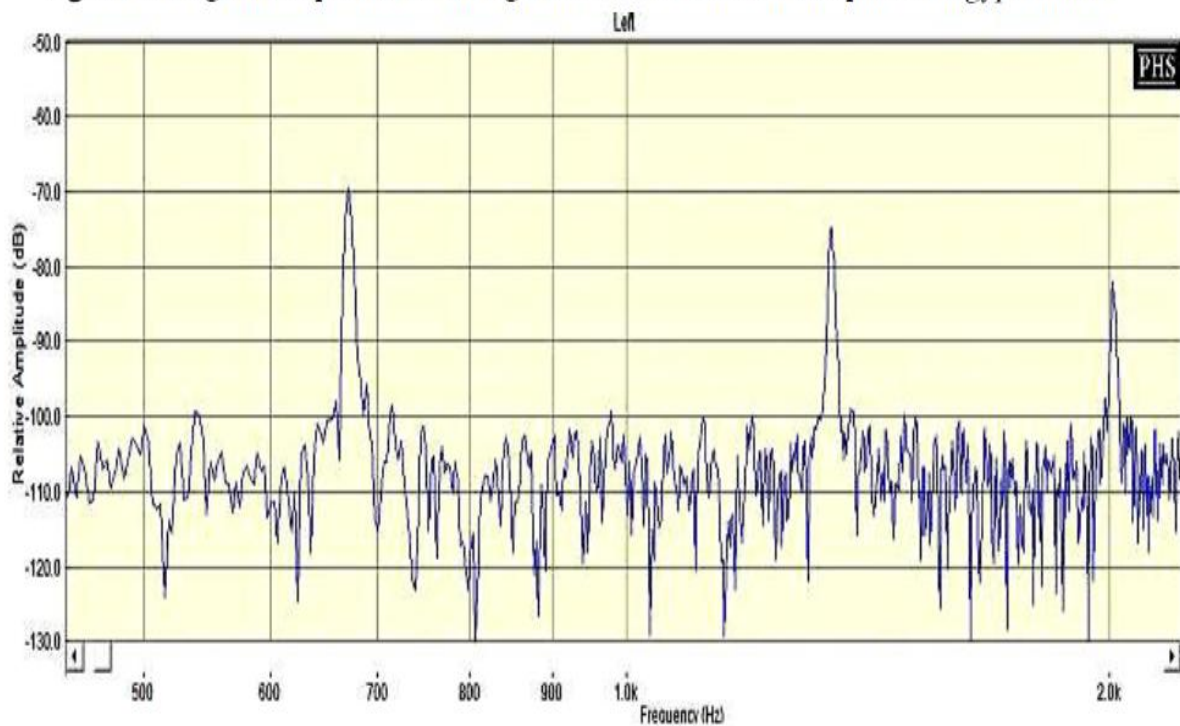


Tabla 1. Valores promedios de frecuencia y desviación estándar por individuo y totales para 18 hembras *Aedes aegypti*

Individuo	Fo (Hz)	Fmax (Hz)	Fmin (Hz)	Desviación estándar (Hz)	Día de emergencia
1	359,01	403,93	344,97	14,2	1
2	516,26	572,02	475,7	16,6	3
3	391,65	429,19	376,83	9,8	1
4	429,36	460,32	408,69	8,5	2
5	424,66	444,94	410,88	6,05	2
6	394,93	421,14	381,22	6,78	1
7	447,31	456,29	439,81	3,46	2
8	529,21	553,34	506,1	8,5	3
9	457,1	485,59	401,59	18,07	2
10	443,11	459,23	425,9	4,3	2
11	443,51	463,98	426,26	5,85	2
12	430,32	457,03	388,18	21,18	2
13	466,14	524,04	450,07	15,48	3
14	526,49	532,83	519,65	3,03	3
15	523,75	536,49	513,42	5,59	3
16	468,44	500,24	469,48	5,48	2
17	547,13	568,35	532,10	7,50	3
18	387,61	420,04	357,78	12,84	1
Promedio total (Hz)		454,78			
Desviación estándar(Hz)		55,19			

Tabla 2. Valores promedios de frecuencia y desviación estándar por individuo y totales para 18 machos *Aedes aegypti*

Individuo	Fo (Hz)	Fmax (Hz)	Fmin (Hz)	Desviación estándar (Hz)	Día de emergencia
1	738,47	811,52	661,37	41,15	3
2	719,61	776,00	695,80	12,15	3
3	678,21	713,01	651,86	17,57	3
4	658,92	682,62	641,97	6,42	2
5	646,83	673,10	631,35	6,47	2
6	643,67	702,76	626,59	8,98	2
7	677,71	712,65	661,74	8,63	3
8	650,36	695,43	622,92	10,43	2
9	627,71	654,79	603,88	9,83	1
10	671,93	693,97	658,08	5,51	2
11	738,88	780,03	697,27	14,02	3
12	695,92	736,82	655,52	21,22	3
13	726,98	809,33	670,90	25,14	3
14	716,88	818,48	676,03	30,73	3
15	737,37	798,71	699,10	15,47	3
16	698,64	715,21	685,55	6,61	3
17	621,83	678,59	589,97	14,47	1
18	741,25	779,30	718,14	11,66	3
Promedio total (Hz)		688,39			
Desviación estándar(Hz)		40,82			